Norma Oficial Mexicana NOM-180-SSA1-1998, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Equipos de tratamiento de tipo doméstico. Requisitos sanitarios.

30-10-00

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.- Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario.- Dirección General de Salud Ambiental.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-180-SSA1-1998. SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO. EQUIPOS DE TRATAMIENTO DE TIPO DOMESTICO. REQUISITOS SANITARIOS.

JAVIER CASTELLANOS COUTIÑO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. y 69-H de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 13 apartado A) fracción I, 118 fracción II y 119 fracción II de la Ley General de Salud; 25 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 41, 43, 45, 46 fracción II, y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 24 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 214 fracción IV y 225 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 13 de diciembre de 1999, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha 19 de junio de 2000, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-180-SSA1-1998, SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO. EQUIPOS DE TRATAMIENTO DE TIPO DOMESTICO. REQUISITOS SANITARIOS

Prefacio

En la elaboración de esta Norma Oficial Mexicana participaron las unidades administrativas e instituciones siguientes:

SECRETARIA DE SALUD.
Dirección General de Salud Ambiental.
Laboratorio Nacional de Salud Pública.
SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA.
Dirección de Normas.
CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE LA TRANSFORMACION.
Consejo Paramédico.
PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR.
BECKTON AND DICKINSON, S.A.
INDUSTRIAS MASS, S.A. DE C.V.
MERCK DE MEXICO, S.A.
HARMONY BROOK DE MEXICO, S.A.
AMWAY DE MEXICO.
OZONO OPTIMO, S.A. DE C.V.
INSTAPURA, S.A. DE C.V.

INDICE

0. Introducción
1. Objetivo
2. Campo de aplicación
3. Referencias
4. Definiciones
5. Símbolos y abreviaturas

6. Clasificación
7. Disposiciones sanitarias
8. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
9. Bibliografía
10. Observancia de la Norma
11. Vigencia
Apéndice Normativo A
Apéndice Informativo A
Apéndice Informativo B

0. Introducción

El objetivo de los programas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano es asegurar que toda la población alcance una dotación adecuada de agua de buena calidad. En México, en la práctica, no se han alcanzado estas metas, por lo que un cierto número de usuarios recurre a métodos intradomiciliarios para subsanar deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal.

Los métodos intradomiciliarios o domésticos para purificar el agua de consumo humano, consisten en la aplicación de equipos de tratamiento y sustancias germicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud y, en casos específicos, a la depuración de características físicas y/o químicas.

La Secretaría de Salud, con el consenso de los sectores involucrados, presenta esta Norma Oficial Mexicana que incluye clasificaciones y disposiciones sanitarias para los equipos de tratamiento que coadyuvarán a elevar la calidad del agua destinada al uso y consumo humano.

1. Objetivo

Esta Norma Oficial Mexicana establece los requisitos que deben cumplir los equipos de tratamiento de agua de tipo doméstico.

2. Campo de aplicación

Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dediquen al proceso e importación de los equipos a que se refiere esta norma.

3. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma Oficial Mexicana es necesario consultar las siguientes:

3.1 NOM-014-SSA1-1993	Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano distribuida por sistemas de abastecimiento públicos y privados.
3.2 NOM-041-SSA1-1993	Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias.
3.3 NOM-092-SSA1-1994	Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
3.4 NOM-110-SSA1-1993	Preparación y dilución de muestras de alimentos para su anális bacteriológico.
3.5 NOM-112-SSA1-1994	Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número má probable.
3.6 NOM-127-SSA1-1994	Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
3.7 NOM-008-SCFI-1993	Sistema general de unidades de medida.

4. Definiciones

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se entiende por:

4.1 Bactericida, a la sustancia o medio que mata o destruye bacterias.

4.2 Bacteriostático, a la sustancia o medio que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, sin matarlas o destruirlas.

4.3 Equipo de tratamiento de agua, de tipo doméstico, al que se instala en punto de uso domiciliario de agua para beber o cocinar, con propósitos de retener, matar, destruir o inhibir las bacterias presentes en ella.

4.4 Germicida, al agente químico que destruye microorganismos especialmente patógenos, lo que no necesariamente incluye la capacidad de destrucción de esporas.
4.5 Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.
4.6 Vida útil, al tiempo que es útil el equipo de potabilización.
5. Símbolos y abreviaturas
El significado de los símbolos y abreviaturas utilizados en esta Norma es el siguiente:

5.1	°C	Grado Celsius.
5.2	g	Gramo.
5.3	l	Litro.
5.4	ml	Mililitro.
5.5	mm	Milímetro.
5.6	nm	Nanómetro.
5.7	NMP	Número más probable.
5.8	pH	Potencial de hidrógeno.
5.9	UFC	Unidades formadoras de colonias.
5.10	%	Por ciento.

6. Clasificación
Los equipos de tratamiento de agua de tipo doméstico objeto de esta norma, se clasifican en la forma siguiente:
6.1 Equipo dosificador de productos o sustancias, químicos bactericidas. El equipo que dosifica un bactericida (cloro, soluciones de cloro, bromo, yodo, u otro producto químico para matar o destruir las bacterias presentes en el agua) debe contar con un elemento posfiltrante para eliminar la concentración residual del bactericida.
6.2 Filtro potabilizador tipo bacteriológico. El dispositivo equipado con una bujía de cerámica, cartucho de celulosa o fibras sintéticas y membrana submicrómica reemplazables (de porosidad fina de 0,5 micras o menores, nominal), la cual puede contener una sustancia o componente bactericida o bacteriostático; este dispositivo retiene, mata, destruye o inhibe las bacterias y retiene asimismo los sólidos suspendidos, presentes en el agua.
6.3 Ozonificador. El dispositivo equipado con un generador de ozono para matar o destruir las bacterias presentes en el agua; debe contar con un elemento prefiltrante (porosidad no mayor de 5,0 micras), para retener los sólidos suspendidos.
6.4 Purificador germicida de luz ultravioleta. El dispositivo para matar o destruir las bacterias presentes en el agua, equipado con una lámpara germicida de luz ultravioleta y que debe contar con un elemento prefiltrante (porosidad no mayor de 5,0 micras) para retener los sólidos suspendidos.
6.5 Otros. Aquellos que la autoridad sanitaria competente determine que se trata de equipos de tratamiento de agua, de tipo doméstico, como se definen en esta Norma y no se contemplan en la clasificación.
7. Especificaciones
7.1 Las personas físicas o morales que se dediquen al proceso e importación de equipos de tratamiento de agua, de tipo doméstico, deben tener a disposición de la autoridad sanitaria, un informe de resultados de laboratorio sobre prueba de potabilidad de cada equipo en particular, de conformidad con el método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana, descrito en el Apéndice Normativo A de esta norma. El laboratorio que efectúe la prueba debe ser acreditado o tercero autorizado.
La prueba de potabilidad es aceptable, cuando el porcentaje en reducción bacteriana es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios e igual o mayor a 99,99% para organismos coliformes totales.
7.2 La Secretaría de Salud determinará los casos en que el agua tratada a través de un equipo de tratamiento de agua, de tipo doméstico, complementariamente a la prueba de eficiencia en reducción bacteriana, debe ser sometida a análisis de sustancias tóxicas provenientes de los elementos o sustancias que componen dicho equipo.
7.3 La Secretaría de Salud determinará de acuerdo con el dictamen o solicitud fundamentada técnicamente de dependencias, organismos oficiales y empresas privadas, o por queja de un usuario, los casos en que un equipo de tratamiento de agua, complementariamente a la prueba de eficiencia en reducción bacteriana, debe ser sometido a pruebas de eficiencia referidas a vida útil (al tiempo que es útil el equipo de potabilización). La prueba de eficiencia referida a vida útil, se efectuará de acuerdo con la normatividad correspondiente.
7.4 Los equipos de tratamiento de agua de tipo doméstico deben ostentar en la etiqueta o contraetiqueta las siguientes leyendas: Utilizar con agua de abastecimiento público y Véase instructivo anexo o leyendas alusivas.
7.5 El instructivo o manual de operación del equipo de tratamiento de agua de tipo doméstico, debe contener cuando

menos la siguiente información en español:
7.5.1 Finalidad de uso.
7.5.2 Instrucciones de operación.
7.5.3 Condiciones de operación incluyendo, en su caso, para finalidad del método de prueba o de verificación sanitaria las restricciones referentes a características de calidad de agua.
7.5.4 Procedimiento de mantenimiento.
7.5.5 Vida útil referida a volumen de agua tratada o a tiempo.
7.6 Las personas físicas o morales referidas en el punto 7.1 de este apartado, deben tener a disposición de la autoridad sanitaria, cuando ésta la requiera, la siguiente información:
7.6.1 Formulación de materias primas y partes componentes del producto.
7.6.2 País de origen de las materias primas y partes componentes del producto o, en su caso, indicar si es en su totalidad de importación. En este último caso se debe señalar la fracción arancelaria comprendida en la Tarifa de la Ley del Impuesto General de Importación.
7.6.3 Etiqueta del producto en español.
8. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente a ninguna norma internacional ni mexicana.
9. Bibliografía
9.1 Bacteriological Analytical Manual C. 5th. Edition. Food and Drug Administration. Division of Microbiology. 1978. EUA.
9.2 Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio para Análisis Microbiológicos de Agua Potable. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud D.G.E. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Reimpresión. México, D.F. 1989.
9.3 Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Thirteen Ed., 1980. Washington D.C. EUA.
9.4 Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1995. Washington D.C. EUA.
9.5 Procedimiento Normalizado de Operación PNO-RMPM-001 para la Evaluación de Germicidas. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Departamento de Evaluación de Riesgos Microbianos y Parasitarios. S.S.A. México, D.F. 1995.
9.6 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 14th Ed. Washington D.C. 1975 pp. 875-880. EUA.
9.7 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 17th Ed. Washington D.C. 1992. EUA.
9.8 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 18th Ed. Washington D.C. 1995. EUA.
10. Observancia de la norma
La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los gobiernos de las entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia.
11. Vigencia
La presente norma oficial mexicana estará vigente a los 60 días naturales después de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.
Sufragio Efectivo. No Reelección.
México, D.F., a 21 de septiembre de 2000.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, Javier Castellanos Coutiño.- Rúbrica.

APENDICE NORMATIVO A

METODO DE PRUEBA PARA EVALUAR LA EFICIENCIA EN REDUCCION BACTERIANA

1. Introducción
La eficiencia de un equipo en la reducción bacteriana, está dada por su capacidad para retener, destruir o matar la carga microbiana presente en el agua cuando existe alguna contaminación eventual. Esta eficiencia depende del diseño del equipo y el principio en que esté basada su actividad.
2. Objetivo
Demostrar si el equipo cumple con las propiedades que le son atribuidas por el fabricante, bajo las condiciones de operación descritas por el mismo.

3. Método

Se inocula una fuente de agua con un número conocido de colonias del microorganismo seleccionado para probar la eficiencia del equipo. Posteriormente, el agua se somete al proceso descrito en el Instructivo del equipo, proporcionado por el fabricante.

Se toman muestras del agua de prueba antes y después de haberse sometido al tratamiento, de acuerdo con la NOM-014-SSA1-1993. Se efectúan cuentas microbianas en dichas muestras para constatar que se redujo el número de gérmenes en el agua tratada.

4. Material y equipo

- Autoclave provisto de termómetro y/o manómetro, capaz de alcanzar temperatura de esterilización de 121 ± 2°C, probado con termómetro de máximas.
- Espectrofotómetro con escala de Transmitancia o Nefelómetro de Mc Farland.
- Horno para esterilizar a 160-180°C.
- Incubadora de aire, con circulación mecánica, para operar a una temperatura de 35 ± 2°C.
- Baño de agua, con circulación mecánica y mezcla de agua, para operar a una temperatura de 44,5 ± 0,2°C.
- Potenciómetro
- Pipetas serológicas estériles de 1 y 10 ml de capacidad, con graduación de una décima de su volumen total. (Se recomienda contar complementariamente con pipetas de 2, 5 y 11 ml de capacidad).
- Tubos de cultivo de 22 x 175 mm, 20 x 200 mm, 16 x 160 mm y 10 x 100 mm, con tapa metálica o de rosca.
- Botellas de Roux.
- Asa de platino o micromel.
- Contador manual.
- Contador de colonias.
- Cajas de Petri estériles de 100 X 15 mm.
- Mecheros Fisher o Bunsen.
- Solución salina estéril al 0,85% (8,5 g de cloruro de sodio, grado analítico en 1000 ml de agua).

5. Medios de cultivo

5.1 Agar nutritivo A.

- Extracto de carne	3,0 g
- Peptona	5,0 g
- Agar libre de sales	15,0 g
- Agua destilada	1000,0 ml

Poner a ebullición durante tres minutos el extracto de carne y la peptona (Bacto o equivalente); agregar el agar y calentar, agitando continuamente hasta disolver.

Distribuir en tubos de 10 x 100 mm y esterilizar 20 minutos a 121°C (el medio no debe sufrir sobrecalentamiento, lo que se evita por un precalentamiento del autoclave).

Utilizar este medio para efectuar los subcultivos.

5.2. Agar nutritivo B.

Preparar del mismo modo que el Agar nutritivo A, descrito en el punto 5.1, pero agregando 30 g de agar libre de sales en lugar de los 15 g especificados en dicho punto.

Distribuir 20 ml del medio en cada botella de Roux.

Utilizar este medio para preparar el cultivo de referencia.

6. Microorganismo de prueba

Cepa de Escherichia coli ATCC 11229

7. Preparación del cultivo de referencia

Tomar una asada de la cepa de Escherichia coli y sembrar en una botella de Roux con agar nutritivo B; incubar de 20 a 24 horas a una temperatura de 35 ± 2°C. Hacer por lo menos tres siembras.

8. Preparación del subcultivo

Tomar una asada de cada cultivo de referencia y resembrar en tubos independientes con Agar nutritivo A; incubar 20-24 horas a una temperatura de 35 ± 2°C.

9. Preparación de la suspensión de Escherichia coli

9.1. A partir del subcultivo en tubo ya desarrollado, adicionar 5 ml de solución salina al 0,85% estéril y agitar suavemente en forma manual, rotando verticalmente el tubo entre las dos manos, para obtener una suspensión bacteriana, la cual se transfiere a un tubo estéril.

9.2. Determinación de la concentración de organismos mesófilos aerobios en la suspensión de Escherichia coli, utilizando uno de los dos métodos que se presentan en los puntos 9.2.1 y 9.2.2.
9.2.1 Método espectrofotométrico.
Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla 1.

Tabla 1

370	420	490	530	550	580	650	LONGITUD DE ONDA EN nm
% TRANSMITANCIA CON FILTROS							UFC/ml x 10^9
7,0	4,0	6,0	6,0	6,0	7,0	8,0	13,0
8,0	5,0	7,0	7,0	7,0	8,0	9,0	11,5
9,0	6,0	8,0	8,0	8,0	9,0	10,0	10,2
10,0	7,0	9,0	9,0	9,0	10,0	11,0	8,6
11,0	8,0	10,0	10,0	10,0	12,0	13,0	7,7
13,0	9,0	12,0	12,0	12,0	13,0	15,0	6,7

Nota. La calibración del aparato debe realizarse con solución salina estéril.
9.2.2 Método nefelométrico.
Determinar la concentración de bacterias en UFC/ml, utilizando la Tabla 2.

Tabla 2

Solución de $BaCl_2$ al 10% ml	Solución de H_2SO_4 al 1,0% ml	Escala de Mc Farland	UFC millones/ml
0,1	9,9	4,0	300
0,2	9,8	3,7	600
0,3	9,7	3,5	900
0,4	9,6	3,4	1 200
0,5	9,5	3,3	1 500
0,6	9,4	3,2	1 800
0,7	9,3	3,15	2 100
0,8	9,2	3,10	2 400
0,9	9,1	3,04	2 700
1,0	9,0	3,00	3 000

9.3 Diluir la suspensión bacteriana con solución salina estéril al 0,85%, a la transmitancia o turbiedad elegida, de acuerdo con la concentración de bacterias establecida en el punto 10.2.
10. Preparación de agua de prueba
10.1 El agua de prueba se debe preparar con agua de sistema de abastecimiento público, ajustada o que cumpla con los límites permisibles de la NOM-127-SSA1-1994, en los parámetros que incidan o afecten la eficiencia del equipo de tratamiento, conforme al contenido del instructivo respectivo, proporcionado por el fabricante o distribuidor al laboratorio acreditado que efectúe la prueba.
10.2 Preparar un volumen de 100 litros de agua de prueba, libre de bactericidas y bacteriostáticos, para operar el equipo inoculando el volumen de suspensión de Escherichia coli requerido, para alcanzar una carga total de bacterias (organismos mesófilos aerobios) de 5 000 a 10 000 UFC/ml y una concentración de organismos coliformes totales mayor o igual a 240 NMP/100 ml o UFC/100 ml.
10.3 Determinar para el agua de prueba la concentración real de organismos mesófilos aerobios en UFC/ml de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 y la concentración real de organismos coliformes

totales de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices Informativos A y B.

11. Desarrollo de la prueba

11.1 Instalar el equipo y operarlo con agua de prueba, de acuerdo con el instructivo respectivo del fabricante o distribuidor.

11.2 Alimentar el equipo con agua de prueba.

11.3 Después de 10 minutos de operar el equipo, tomar tres muestras de agua de prueba sin tratar y a continuación tres muestras de agua tratada; determinar la concentración de organismos mesófilos aerobios en UFC/ml de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 y la concentración de organismos coliformes totales de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 o con los métodos alternativos presentados en los Apéndices Informativos A y B.

12. Cálculos

Con los resultados de cuenta de organismos mesófilos aerobios y la concentración de organismos coliformes totales en agua de prueba sin tratar y tratada (media aritmética), calcular los porcentajes en la reducción bacteriana de acuerdo con las fórmulas especificadas en los puntos 12.1 y 12.2.

12.1 Porcentaje en reducción bacteriana de organismos mesófilos aerobios:

$$\% \text{ RBMA} = \frac{(\text{organismos mesófilos aerobios})_{APST} - (\text{organismos mesófilos aerobios})_{APT}}{(\text{organismos mesófilos aerobios})_{APST}} \times 100$$

En donde:

% RBMA.- Porcentaje en reducción bacteriana de organismos mesófilos aerobios.

$(\text{organismos mesófilos aerobios})_{APST}$.- Cuenta de organismos mesófilos aerobios en UFC/ml de agua de prueba sin tratar.

$(\text{organismos mesófilos aerobios})_{APT}$.- Cuenta de organismos mesófilos aerobios en UFC/ml de agua de prueba tratada.

12.2 Porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales.

$$\% \text{ RBCT} = \frac{(\text{coliformes totales})_{APST} - (\text{coliformes totales})_{APT}}{(\text{coliformes totales})_{APST}} \times 100$$

En donde:

% RBCT. Porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales.

$(\text{coliformes totales})_{APST}$.- Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 ml o UFC/100 ml de agua de prueba sin tratar.

$(\text{coliformes totales})_{APT}$.- Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 ml o UFC/100 ml de agua de prueba tratada.

13. Reporte

Prueba de potabilidad aceptable, si el porcentaje en reducción bacteriana es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios e igual o mayor a 99,99% para organismos coliformes totales.

APENDICE INFORMATIVO A.

DETERMINACION DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES. METODO DEL SUSTRATO CROMOGENICO (Ver Nota1 a pie de página)

1. Introducción

La determinación de organismos coliformes por medio del sustrato cromogénico, se fundamenta en el uso de sustratos cromogénicos hidrolizables para la detección de enzimas de bacterias coliformes. Cuando se utiliza esta técnica, el grupo se define como todas las bacterias que poseen la enzima ß-D-galactosidasa y capaces de romper el sustrato cromogénico, dando como resultado una liberación del cromógeno. A diferencia del método de fermentación de lactosa que permite el crecimiento de muchos organismos aeróbicos y elimina o suprime algunos no-coliformes con inhibidores químicos, esta técnica provee nutrientes que son más selectivos y específicos para el crecimiento de coliformes. La prueba puede usarse tanto en tubos múltiples como en formato presencia-ausencia

(muestras individuales de 100 ml). La obtención de resultados válidos requiere la aplicación estricta de los procedimientos de control de calidad.

2. Principio

El sustrato cromogénico tal como el orto-nitrofenil-ß-D galactopiranósido (ONPG) u otro equivalente, es empleado para detectar la enzima ß-D-galactosidasa, la cual es producida por bacterias coliformes totales. La enzima ß-D-galactosidasa hidroliza al sustrato y provoca un cambio de color, el cual indica y sustenta una prueba positiva después de 24 a 28 horas sin procedimientos adicionales. Las bacterias no coliformes, tales como las especies del género Aeromonas y Pseudomonas, que producen pequeñas cantidades de la enzima ß-D-galactosidasa, son suprimidas y no pueden producir una respuesta positiva durante las 28 horas a menos de que más de 10^4 (10 000) unidades formadoras de colonias (UFC) por ml (10^6 UFC/100 ml) estén presentes.

3. Aplicaciones

La prueba de coliformes con sustrato cromogénico se recomienda para el análisis de muestras de agua potable, agua purificada o agua limpia proveniente de cualquier fuente. Inicialmente, los laboratorios planearon usar este procedimiento conduciendo pruebas paralelas con una de las pruebas de coliformes estándar por un periodo de varios meses para evaluar la efectividad de la prueba para el tipo específico de agua analizada y para determinar el número relativo de pruebas positivas obtenido por las dos técnicas.

Las muestras de agua que contienen materiales húmicos o de otro tipo pueden estar coloreadas. Si hay color de fondo, se comparan los tubos inoculados con un tubo de control conteniendo únicamente muestra de agua. Ciertas aguas con alto contenido de sales de calcio pueden causar precipitación, pero ésta no debe afectar la reacción.

La prueba del sustrato cromogénico no se usa para verificar siembras presuntivas de coliformes o colonias de filtración con membrana porque el sustrato puede ser sobrecargado por el inóculo pesado de ß-D-galactosidasa débil producido por no-coliformes, causando resultados falsos positivos.

En lo que se refiere a Escherichia Coli, un sustrato fluorogénico como el 4-metilumbeliferil-ß-D-glucorónido (MUG) es utilizado para detectar la enzima ß-glucoronidasa, la cual es producida por E. Coli. La enzima ß-glucoronidasa hidroliza el sustrato, produciendo fluorescencia cuando el líquido es expuesto a la luz ultravioleta de onda larga (366 nm). La presencia de fluorescencia indica una respuesta positiva para E. coli. Algunas Shigella spp también pueden producir una respuesta positiva. Debido a que Shigella spp son reconocidas como patógenas humanas, no están consideradas como perjudiciales para probar la calidad sanitaria del agua.

4. Formulación del sustrato

Las formulaciones del sustrato se presentan comercialmente en tubos para el procedimiento de tubos múltiples o en recipientes para muestras de 100 ml para la determinación de presencia/ausencia. También son aprovechables porciones prepesadas del reactivo para mezclar y dosificar en tubos múltiples para pruebas de 10 ml u otros recipientes para muestras de 100 ml. Se requiere de un proveedor confiable para el aseguramiento de calidad y uniformidad del sustrato comercial. Se debe evitar la exposición prolongada del sustrato a la luz directa del sol.

La formulación en polvo contiene los siguientes compuestos anhidros (por litro de sustrato preparado) (Ver Nota 2 a pie de página)

Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$	5,00 g
Sulfato de manganeso, $MnSO_4$	0,0005 g
Sulfato de zinc, $ZnSO_4$	0,0005 g
Sulfato de magnesio, $MgSO_4$	0,10 g
Cloruro de sodio, NaCl	10,0 g
Cloruro de calcio, $CaCl_2$	0,05 g
Sulfito de sodio, Na_2SO_3	0,04 g
Amfotericina B	0,001 g
O-Nitrofenil-ß-D-galactopiranósido	0,50 g
4-Metilumbeliferil-ß-D-glucorónido	0,075 g
Solanio (Ver Nota 3 a pie de página)	0,50 g
Buffer Hepes de sal de sodio	5,3 g
Buffer Hepes de ac, orgánicos (Ver Nota 4 a pie de página)	6,9 g

5. Procedimiento

5.1 Procedimiento de tubos múltiples. Seleccione el número apropiado de tubos por muestra con medio

predosificado para la prueba de tubos múltiples y rotule. Siga las instrucciones del fabricante para preparar la serie de diluciones. Asépticamente, adicione 10 ml de muestra a cada tubo, tape herméticamente y agite vigorosamente para disolver. La mezcla resultante es incolora. Algunas partículas pueden resultar insolubles durante la prueba, esto no afectará su desarrollo.

El procedimiento también puede ser desarrollado con la adición de cantidades apropiadas del sustrato reactivo a la muestra, mezclando vigorosamente y dosificando en cinco o diez tubos estériles. Incube a 35±0,5°C por 24 horas.

5.2 Procedimiento de presencia/ausencia. Adicione asépticamente sustrato enzimático prepesado a 100 ml de muestra en un vaso, estéril, transparente, no fluorescente de borosilicato o en una botella o recipiente equivalente. Opcionalmente adicionar 100 ml. de muestra al sustrato enzimático en un recipiente provisto por el fabricante. Tape asépticamente y mezcle vigorosamente para disolver. Incube a 35+0,5°C por 24 horas.

6. Interpretación

Después de 24 horas de incubación examine si existe cambio de color en los tubos o recipientes. Cuando el sustrato es orto-nitrofenil-ß-D-galactopiranósido (ONPG) es hidrolizado por la enzima de la bacteria para producir ortonitrofenol amarillo; algunos sustratos usados en otras formulaciones pueden producir respuestas de diferente color. La respuesta cromogénica descrita es una reacción positiva para coliformes totales. Si el cambio de color no es uniforme en todo el tubo, mezcle por inversión antes de la lectura. Comparar cada tubo nuevamente con el comparador de color disponible de la fuente comercial del sustrato. Si la intensidad del color es mayor o igual a la del comparador, los coliformes totales están presentes. Las muestras son negativas para coliformes totales si no se observa color. Si la respuesta cromogénica es cuestionable después de 24 horas, incube 4 horas más. Si se intensifica el cromógeno, la muestra es positiva para coliformes totales; si no sucede esto, la muestra es negativa.

7. Reporte

Si se desarrolló el procedimiento de NMP, calcular el valor de NMP del número de tubos o celdas positivos, de acuerdo con las tablas de número más probable, correspondientes al sistema utilizado. Si se utiliza el procedimiento de presencia/ausencia, reportar resultados de coliformes totales presentes a ausentes en 100 ml de muestra.

8. Control de calidad

Pruebe cada lote de sustrato comercial desarrollando la prueba por inoculación con tres bacterias de control; Escherichia coli, otra coliforme total diferente a E. coli (por ejemplo Enterobacter cloacae) y una no coliforme. Evite el uso de inóculos pesados. Si se usan Pseudomonas como el no coliforme representativo, seleccione una especie no fluorescente. Incube estos controles a 35 ± 0,5°C por 24 horas. Lea y registre los resultados.

9. Bibliografía

Edberg. S.C., M.J. Allen, D.B.Smith & the National Collaborative Study, 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. Appl. Environ. Microbiol. 54:1595.

Edberg, S.C. & M.M. Edberg, 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. Yale J. Biol. Med. 61:389.

Covert, T.C., L.C. Shadix, E.W. Rice, J.R. Haines & R.W. Frey Berg, 1989. Evaluation of the autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. Appl. Environ. Microbiol. 55:2443.

Edberg, S.C. .& D.B. Smith, 1989. Absence of association between total heterotrophic and total coliform bacteria from a public water supply. Appl. Environ. Microbiol 55:380.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & the National Collaborative Study, 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol. 55:1003.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith & N.J. Kaiz, 1990. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by tha defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol. 56:366.

Edberg S.C., M.J. Allen, D.B. Smith, 1991. Defined substrate technology method for rapid ans simultaneous enumeration of total coliforms and Escherichia coli from water: Collaborative study. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 74:526.

Edberg, S.C., F. Ludwig & D.B. Smith, 1991. The Colilert System for total coliforms and Escherichia coli. American Water Works Research Foundation, Denver, Colo.

APENDICE INFORMATIVO B

DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES-METODO DE FILTRACION

POR MEMBRANA

1. Fundamento

Este método se basa en la filtración de una muestra para concentrar células viables sobre la superficie de una membrana y transferirlas a un medio de cultivo apropiado, para posteriormente contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas después de la incubación.

2. Material

- Autoclave con termómetro y manómetro, capaz de alcanzar temperaturas de esterilización.
- Material para envolver esterilizable (papel kraft, bolsas de polímero resistentes al calor, otros).
- Membranas para filtración estériles con poro de 0,45 milimicras y cojinetes absorbentes de 47 mm de diámetro.
- Sistema de filtración.
- Sistema de luz ultravioleta para esterilización de las unidades de filtración.
- Bomba de vacío (20-27 pulgadas Hg), tubería y aditamentos herméticos para mantener el vacío.
- Matraz Kitazato.
- Cajas Petri desechables o de vidrio estériles de 50 x 90 mm.
- Marcador indeleble o equivalente.
- Pinzas de acero inoxidable.
- Propipeta de 50 ml de capacidad.
- Botellas de borosilicato con capacidad de 150 ml y tapa de rosca.
- Pipetas bacteriológicas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml de capacidad, estériles y protegidas con tapón de algodón.
- Utensilios estériles como: cucharas, cucharones, picahielos, destapadores, abrelatas, entre otros.
- Microscopio estereoscópico, óptico o equivalente.
- Incubadora ajustada a temperatura de 35ºC ± 1ºC.
- Contador mecánico o manual de Tally.
- Recipientes estériles para muestras (frascos, botellas, jarras, bolsas, otros).
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.
- Portaasa y asa bacteriológica.
- Portaobjetos.

3. Reactivos y medios de cultivo

3.1 Agar cuenta estándar

Preparar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o por ingredientes:

El pH final debe ser de 7.0 ± 0,2 después de esterilizar a 121ºC durante 15 minutos.

3.2 Agar ENDO LES

3.2.1 Ingredientes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	1,2
Casitona o tripticasa	3,7
Tiopeptona o tiotona	3,7
Triptosa	7,5
Lactosa	9,4
Fosfato ácido de potasio - K_2HPO_4	3,3
Fosfato de potasio - K_3PO_4	1,0
Cloruro de sodio - NaCI	3,7
Desoxicolato de sodio	0,1
Lauril sulfato de sodio	0,05
Sulfito de sodio - Na_2SO_3	1,6
Fucsina básica	0,8
Agar	15,0
Agua grado reactivo	1000,0 ml

3.2.2 Preparación

Rehidratar el medio en un litro de agua que contenga 20 ml de etanol al 95%, no desnaturalizado (lo cual reduce el crecimiento Background y el tamaño de la colonia). Llevar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar a 45-50ºC. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser 7,0 ± 0,2. Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml

dentro de cajas de Petri de 60 mm de vidrio o plástico. Si se utilizan placas de otro tamaño, ajustar la cantidad de medio. No exponer las placas a la luz directa del sol. Almacenar en la oscuridad de 4 a 8ºC, preferiblemente en bolsas de plástico selladas u otros recipientes para reducir la pérdida de humedad. Descartar el medio que no se utilizó después de 2 semanas.

3.3 Medio ENDO

3.3.1 Ingredientes	Cantidad (g)
Triptosa o polipeptona	10,0
Tiopeptona o tiotona	5,0
Casitona o tripticasa	5,0
Extracto de levadura	1,5
Lactosa	12,5
Cloruro de sodio - NaCl	5,0
Fosfato ácido dipotásico - K_2HPO_4	4,375
Fosfato dihidrógeno potásico - KH_2PO_4	1,375
Lauril sulfato de sodio	0,05
Desoxicolato de sodio	0,10
Sulfito de sodio - Na_2SO_3	2,1
Fuscina básica	1,05
Agar (opcional)	15,0
Agua grado reactivo	1000,0 ml

3.3.1 Rehidratar el medio en un litro de agua que contenga 20 ml de etanol al 95%. Calentar hasta ebullición para disolver el agar, retirar del calor y enfriar entre 45-50ºC. Distribuir en cantidades de 5 a 7 ml a cajas de Petri desechables o de vidrio de 60 mm de diámetro. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser de 7,1 – 7,3.

Almacenar el medio (Caldo o Agar) en la oscuridad de 4 a 8ºC y descarte cualquier caldo de medio sin usar después de 96 horas y el agar sin usar después de 2 semanas.

Medio líquido: 2 ml por placa, sin agar; se puede usar un cojinete absorbente si está certificado, libre de sulfito u otro agente tóxico a una concentración que pueda inhibir el desarrollo bacteriano.

4. Procedimiento

Generalmente, el enriquecimiento del medio de cultivo puede mejorar la valoración de la calidad del agua para beber. Sin embargo, este paso puede eliminarse en el análisis de rutina de este tipo de agua ya que varios estudios mostraron que se obtienen resultados adecuados por la técnica simple de filtración por membrana en un solo paso. Sin embargo, se recomienda que, en lo posible, se verifiquen todas las muestras de agua que den resultados positivos.

4.1 Selección del tamaño de muestra

El tamaño de muestra lo determina la densidad bacteriana, lo cual en muestras de agua para beber estará limitado sólo por el grado de turbiedad o por el crecimiento de bacterias no coliformes sobre el medio.

El volumen de muestra sugerida para prueba de coliformes totales y coliformes fecales por esta técnica es de 100 ml.

4.2 Filtración de la muestra

Utilizando pinzas estériles, colocar una membrana estéril (cuadriculado hacia arriba) sobre el portafiltro poroso. Cuidadosamente coloque el embudo sobre el receptáculo y asegúrelo en su lugar. Filtre la muestra bajo vacío parcial, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de tres porciones de 20 a 30 ml de solución buffer estéril. Una vez complementado el enjuague final y que el proceso de filtración haya concluido, quitar el embudo e inmediatamente después retire la membrana con pinzas estériles y colóquela sobre el medio selectivo con un movimiento circular a fin de evitar la entrada de aire. Meter un control de 100 ml de solución buffer estéril cada 10 muestras para checar posible contaminación cruzada o buffer contaminado. Incubar el control bajo las mismas condiciones de la muestra.

Usar unidades de filtración estériles al principio de cada serie de filtraciones, como precaución mínima para prevenir contaminación accidental. Una serie de filtraciones se considera cuando hay un intervalo de interrupción de 30 minutos o más entre cada filtración de muestras. Después de tales interrupciones, tratar cualquier muestra como una serie de filtración y esterilizar toda la unidad de filtración en uso. Descontaminar este equipo entre filtraciones

sucesivas, ya sea por medio de luz ultravioleta (UV) o esterilizando apropiadamente en autoclave de acuerdo con las características del equipo. No exponer la preparación de cultivo con el filtro de membrana al rango de radiación UV que pueda salir de la cabina de esterilización. Se recomienda protegerse los ojos, pueden usarse lentes de seguridad o de vidrio prescritos para la adecuada protección contra la luz UV de la columna de esterilización, que no se aísle durante el tiempo de exposición. Limpie el tubo de UV regularmente y cheque periódicamente su efectividad para asegurar que haya un 99,99% de muerte bacteriana en 2 minutos de exposición.

4.3 Técnica de enriquecimiento

Colocar un cojinete absorbente en una caja de Petri estéril y pipetear 1,8 a 2,0 ml de caldo lauril triptosa para saturar el cojinete. Cuidadosamente remueva cualquier exceso de líquido del cojinete. Asépticamente colocar sobre el cojinete una membrana a través de la cual se haya filtrado una muestra de agua, incubar la membrana sin invertir la caja durante 15 a 20 horas a 35 ± 0,5ºC en una atmósfera de 90% de humedad relativa.

Si se usa el medio de agar base tipo ENDO, remover el enriquecimiento de la incubadora, separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del agar. La colocación incorrecta de la membrana a su vez se pone de manifiesto, porque partes de la membrana no se tiñen, lo cual indica entrada de aire. Donde suceda esto, cuidadosamente resitúe la membrana sobre la superficie de agar. Si se usa medio líquido, colocar un cojinete estéril nuevo en el fondo de la caja y saturar con 1,8 – 2,0 ml de medio M-ENDO; separar la membrana del cojinete con el enriquecimiento y colocar sobre la superficie del M-ENDO, con las precauciones antes descritas. Descartar el cojinete de enriquecimiento utilizado.

A continuación, con el medio ya sea agar o líquido (con cojinete), invertir las placas e incubar por 20 - 22 horas a 35 ± 0,5ºC.

4.4 Técnica alternativa directa en paso simple

Si se usa medio de agar base, colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el agar como se describió anteriormente en el apartado 4.3 e incubar por 24 ± 2 horas a 35 ± 0,5ºC.

Si se usa medio líquido, colocar un cojinete sobre la placa y saturar con 1,8 a 2,0 ml de medio M-ENDO. Colocar la membrana después de filtrar la muestra de agua, directamente sobre el cojinete; invierta la caja e incube por 24 ± 2 horas a 35 ± 0,5ºC.

4.5 Conteo: Para determinar la cuenta de colonias sobre el filtro de membrana, usar un microscopio binocular de disección de bajo poder (10 a 15 aumentos) u otro aparato óptico similar, con lámpara fluorescente de luz blanca con rango perpendicular, tanto como sea posible al plano del filtro.

Las colonias típicas de coliformes totales tienen color rojo oscuro con brillo metálico. El área brillante puede variar de tamaño desde que sólo brille la parte superior de la colonia hasta que abarque la superficie total de la colonia, las colonias atípicas de coliformes pueden ser rojo oscuro o nucleadas sin brillo. Las colonias que no tengan brillo pueden ser rosas, rojas, blancas o incoloras y se consideran no coliformes. No existe correlación entre la cuenta de colonias (coliformes o no coliformes) sobre el medio tipo ENDO y el número total de bacterias presentes en la muestra original. Sin embargo, una cuenta alta de bacterias no coliformes puede interferir con el máximo desarrollo de coliformes. La refrigeración de los cultivos (después de 22 horas de incubación) con alta densidad de colonias no coliformes de 0,5 a 1 hora antes de contar puede prevenir la dispersión y puede ayudar a discernir el brillo metálico. La incubación anaeróbica a 35ºC por 24 horas de algunas muestras de agua subterránea, pueden suprimir el desarrollo de colonias de no coliformes, pero debe ser cuidadosamente evaluada para asegurar no perder la recuperación de los coliformes.

Las muestras de agua tratada, efluente o residual puede incluir bacterias estresadas que crecen relativamente lento y producen un máximo brillo en 22-24 horas. Los organismos de fuentes no tratadas pueden producir brillo a las 16-18 horas y el brillo puede, subsecuentemente, disminuir después de 24-30 horas.

4.6 Verificación de los coliformes

Ocasionalmente, las colonias de no coliformes aparecen como colonias típicas con brillo. Las colonias atípicas (rojo oscuro, nucleadas sin brillo metálico) ocasionalmente pueden ser coliformes. Es recomendable verificar ambos tipos de colonias, mediante una prueba de fermentación de lactosa o por el uso de procedimientos alternativos, que involucren ambos una prueba rápida (4 horas) o por reacciones bioquímicas típicas o un sistema multiprueba para especies.

4.6.1 Fermentación de la lactosa.

Verificar colonias típicas y atípicas incluidas en la cuenta directa; probar un mínimo de 5 de tales colonias, por trasferencia del crecimiento de cada colonia en caldo lauril triptosa, incubar a 35 ± 0,5ºC durante 48 horas.

La formación de gas en caldo lauril triptosa y su conformación en caldo lactosa con verde brillante dentro de las 48

horas verifica a la colonia probada como coliforme.
4.6.2 Verificación alternativa de coliformes.
Aplicar este procedimiento alternativo de verificación de coliformes para colonias aisladas sobre el filtro de membrana. Si no hay colonias aisladas o si la separación entre las colonias es de menos de 2 mm, estriar el crecimiento a medio M-ENDO para asegurar la pureza del cultivo y transferir al tubo de fermentación.
4.6.2.1 Prueba rápida.
Una verificación rápida de las colonias es la prueba de citocromo oxidasa (CO) y Beta-galactoxidasa (ONPG). La reacción de los coliformes es de CO negativa y ONPG positiva con 4 horas de incubación del tubo de cultivo o procedimiento de microprueba.
4.6.2.2 Sistema multiprueba comercial.
Verificar las colonias por estrías para su purificación, seleccionar colonias perfectamente aisladas e inocular dentro de un sistema multiprueba para enterobacterias que incluya reacciones de fermentación de lactosa, CO y ONPG.
5. Cálculos
Cálculo de la densidad de coliformes.
Hacer el conteo, usando filtros de membrana con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias para cualquier tipo de colonia según la siguiente ecuación:

$$\text{Colonias de coliformes totales/100 ml} = \frac{\text{Colonias de coliformes contadas}}{\text{ml de muestra filtrados}} \times 100$$

5.1 Agua con finalidad para consumo humano (considerando las especificaciones establecidas en la NOM-127-SSA1-1994).
Con agua de buena calidad, la presencia general de coliformes es mínima. Por lo tanto, se deben contar todas las colonias de coliformes (cajas con 20 a 80 colonias) y usar la fórmula dada anteriormente para obtener la densidad de coliformes.
Si existe un crecimiento confluente, que es un desarrollo que cubre el área de filtración completa de la membrana o una porción y las colonias no están bien distribuidas, reportar los resultados como “crecimiento confluente con (sin) coliformes” y solicite un nuevo muestreo del mismo sitio. Si el número total de colonias bacterianas, coliformes o no coliformes excede las 200 por membrana o si las colonias no son suficientemente distinguibles una de la otra para asegurar el conteo, reporte los resultados como “Demasiado numerosas para contar” (DNPC). La presencia de coliformes en tales cultivos, se verifica mediante la colocación del filtro de membrana completo dentro de un tubo estéril con caldo bilis verde brillante. Como alternativa arrastre la superficie completa del cultivo de la membrana con una asa estéril o con un isopo de algodón estéril e inocule a un tubo de caldo lactosado y a otro de caldo bilis verde brillante.
Si se produce gas de este cultivo dentro de las 48 ± 3 horas a 35 ± 0,5ºC, se concluye la presencia de coliformes.
Se recomienda reportar “Crecimiento confluente” o “Demasiado numerosas para contar” con al menos una colonia de coliformes detectable (verificada) como una muestra positiva de coliforme total. No se recomienda reportar únicamente “Crecimiento confluente” o “Demasiado numerosas para contar”.
Cuando no se detectan coliformes, habiendo utilizado volúmenes de muestra pequeños, se requiere una nueva muestra y seleccionar volúmenes más apropiados para la filtración por membrana. Normalmente se requieren volúmenes de 25, 50 o 100 ml para agua destinada al consumo humano.
Para reducir interferencia de sobrecrecimiento, en lugar de filtrar 100 ml, filtre porciones de 50 ml a través de 2 diferentes membranas, porciones de 25 ml a través de 4 diferentes membranas, y así sucesivamente. La cuenta de coliformes totales observadas sobre todas las membranas se suma y se reporta el número total en 100 ml.